Über das Vorkommen und die Bedeutung der Adenosin- und Adenylat-Desaminase sowie Untersuchungen über die subzelluläre Verteilung von Nucleosid- und Nucleotid-Desaminasen in menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Rainer Häge

Saarbrücken

1973

1974

AUS DER FACHRICHTUNG PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
DES FACHBEREICHES 3 - THEORETISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG/SAAR

Über das Vorkommen und die Bedeutung der Adenosin- und Adenylat-Desaminase sowie Untersuchungen über die subzelluläre Verteilung von Nucleosid- und Nucleotid-Desaminasen in menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe.

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von

Rainer HÄGE

geb. am 4.11.1945 in Neustadt/Weinstraße

Dekan: Professor Dr.med.G.A. JUTZLER

Referent: Professor Dr.rer.nat. E. ZOCH

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am
31.1.1974 abgelegt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	4
A. ÜBER DAS VORKOMMEN UND DIE BEDEUTUNG DER ADENOSIN- UND ADENYLATDESAMINASE	5
I. Adenosin-Desaminase Vorkommen, physiologische Bedeutung und subzelluläre Verteilung	5
II. Adenylat-Desaminase Vorkommen, physiologische Bedeutung und subzelluläre Verteilung	17
B. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON NUCLEOSID- UND NUCLEOTID-DESAMINASEN IN MENSCHLICHEM PLACENTA- UND FRUCHTSACKGEWEBE	2o
I. Fragestellung	2o
II. Methodik	22
1. Zellfraktionierung	23
2. Bestimmung des Eiweißgehaltes der einzelnen Fraktionen (KJELDAHL-Methode)	25
3. Messung der Desaminasen-Aktivitäten nach der pH-Stat-Methode	27
4. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Desaminierung	29
5. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	3o
III. Darstellung der Ergebnisse	32
1. Subzelluläre Verteilung	32
Desaminasen in der Placenta	32
Desaminasen im Fruchtsack	39
2. Der Abbau von Purin und Pyrimidin-Nucleotiden in subzellulären Fraktionen menschlichen Placenta- und Fruchtsackgewebes	42
Placenta	42
Fruchtsack	45

	Seite
IV. Diskussion	48
1. Diskussion der Methodik	48
2. Diskussion der Ergebnisse	51
Die subzelluläre Desaminasenverteilung in Placenta und Fruchtsack	51
Der Abbau der Purin- und Pyrimidin-Nucleotide in Placenta und Fruchtsack	6o
C. ZUSAMMENFASSUNG	64
D. ANHANG	67
E. LITERATUR	7o

EINLEITUNG

Über Desaminierungsreaktionen von Pyrimidin- bzw. Purinnucleosiden- und nucleotiden in menschlichem Placentagewebe liegen bisher nur sehr spärliche Befunde vor, über den Fruchtsack (Definition siehe Seite 20) sind bisher überhaupt keine Untersuchungen durchgeführt worden. Deshalb erschien es geboten, zunächst eine gezielte Untersuchung über die subzelluläre Verteilung von Adenosin- und Adenylat-Desaminase in menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe durchzuführen, die als Grundlage für weitere Arbeiten über die Funktionen bestimmter Desaminasen dienen soll. Die erhaltenen Ergebnisse sollen auch anhand der aus der Literatur bekannten Tatsachen über Adenosin- und Adenylat-Desaminasen diskutiert werden, um Hinweise auf die Bedeutung der Nucleosid- und Nucleotid-Desaminasen für Placenta- und Fruchtsackgewebe zu erhalten. Hierzu ist es notwendig, die wichtigsten Befunde verschiedener Autoren über Vorkommen und Bedeutung der genannten Desaminasen zusammenzustellen.

Bevor auf die Fragestellung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit eingegangen wird, erschien es zweckmäßig, zunächst einen Überblick der neueren Literatur voranzustellen.

A. ÜBER DAS VORKOMMEN UND DIE BEDEUTUNG DER ADENOSIN- UND ADENYLATDESAMINASE

1. Adenosin-Desaminase

Vorkommen, physiologische Bedeutung und subzelluläre Verteilung

(AD, Adenosin-aminohydrolase, EC 3.5.4.4.) setzt Adenosin und einige Adenin-Nucleosid-Analoge spezifisch um (1-3).

Das Enzym ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet (4-7). Seine größte Aktivität wurde in der Dünndarm-Mucosa von Säugetieren gefunden (8). Hohe AD-Aktivitäten finden sich außerdem in Blinddarm und Milz, geringere in Leber, Gehirn, Serum, Placenta, Skelett- und Herzmuskel.

Besonders gut untersucht ist bisher ein aus Rindermucosa isoliertes und gereinigtes AD-Präparat, welches auch im Handel erhältlich ist. Vergleichende Untersuchungen über Substratspezifität, pH-Optimum und elektrophoretische Beweglichkeit zeigen, daß die Adenosindesaminasen verschiedener Säugetiergewebe speciesverschieden sind. Sie scheinen aber innerhalb derselben Species jedoch identisch zu sein (2,5, 9).

Es ist bekannt, daß AD in mehreren molekularen Formen vorliegt (9, 10, 11, 15) und daß Molekulargewicht und V_{max} von Enzympräparaten der verschiedenen Organe einer Species variieren können (11, 12, 13).

Molekulargewichte von Adenosin-Desaminasen verschiedener Species:

Species	MG	verwendete Bestimmungsmethode	Literatur
Mucosa von Rind Katze, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Hund, Schwein	30.600-34.700	Gelfiltration mit Sephadex G75	14
Kaninchen:			
2 molekulare Formen	251.000 (250.000) 34000 (34700)	Gelfiltration mit Sephadex G75, mit Sephadex G200	14
Kalbsduodenal-AD	52.000	Sedimentation u.Diffusion	
Rinderplacenta (materner Anteil) Frühstadium der Schwangerschaft	35.480	Gelfiltration	16

AD ist ein reines Proteinenzym.

Es ist nicht bekannt, daß es irgendwelche prosthetischen Gruppen benötigt oder daß normale physiologische Substanzen für seine Aktivierung erforderlich sind (2, 9, 12).

Amperometrisch-mercurimetrische Titrationen von AD mit anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen deuten auf die Anwesenheit von zwei Sulfhydrylgruppen im Molekül (17-2o), von denen eine wahrscheinlich in einer hydrophoben Region des Enzymmoleküls sitzt und für die Aktivität von wesentlicher Bedeutung ist (21).

Physiologische Bedeutung

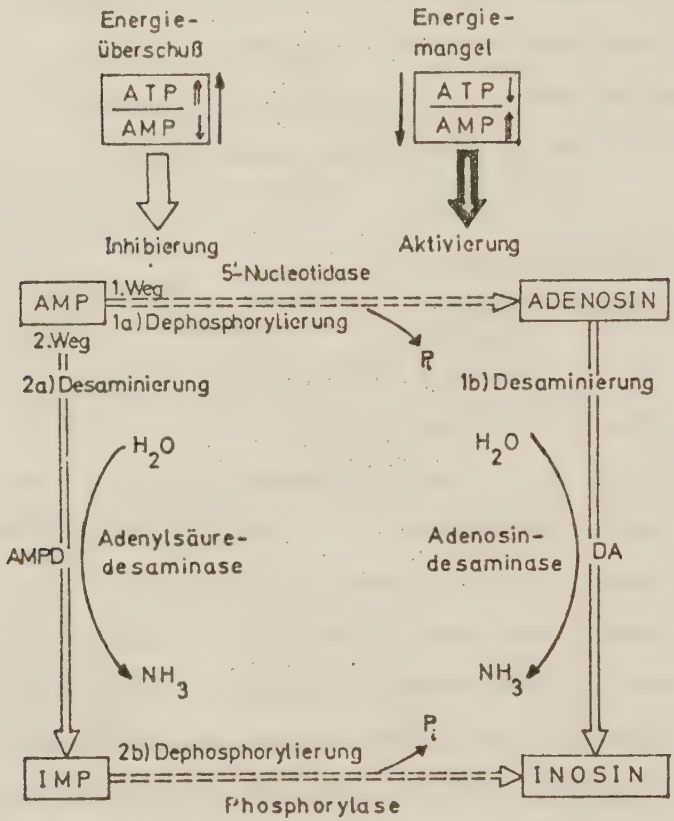
1. Entgiftung von Adenosin

Die Primärfunktion der AD im Organismus scheint die Entgiftung von Adenosin in den Geweben zu sein.

Von Adenosin, AMP, ADP, ATP weiß man seit Jahren, daß sie starke Wirkungen auf das Säugerherz und -Gefäßsystem haben. Sie können Bradykardie, Herzblock und koronare Gefäßerweiterung hervorrufen (22-24). Adenosin spielt eine wichtige Rolle in der koronaren Durchblutung (25-26). Die Reaktion des Säugerherzens auf Adenosin ist speciesabhängig. Meerschweinchenherz ist sehr empfindlich gegenüber geringen Dosen von Adenosin, der Haupteffekt ist ein atrioventrikulärer Block; Katzen und Kaninchen hingegen sind nicht so empfindlich (23).

Im normalen Herzgewebe ist Adenosin nur nach Phasen der Anoxie nachzuweisen (27). Das ischämische Herz setzt demnach Adenosin frei, das wiederum eine koronare Vasodilatation verursacht (28).

Man vermutet folgenden Regulationsmechanismus (nach 29-31):



Im normalen Herzgewebe wird Inosin sowohl durch Dephosphorylierung von IMP, als auch durch Desaminierung von Adenosin gebildet, mit dem Ergebnis, daß Adenosin unter einem nachweisbaren Spiegel gehalten wird.

Während Hypoxie muß die Bildung von Adenosin entweder beschleunigt, oder sein Abbau verhindert werden.
ATP ist ein starker kompetitiver Inhibitor der 5'-Nucleotidase.

Unter Bedingungen des Energieüberschusses ist der ATP-Spiegel im Herzen hoch, während der von AMP niedrig ist (31). Nach dem Einsetzen von Hypoxie kann der AMP-Spiegel um das Vierfache steigen, während der von ATP ca. 2o % fällt (32); dadurch wird die Inhibierung der 5'-Nucleotidase aufgehoben, was einen Anstieg des Adenosins zur Folge hat.
Ein erhöhter Adenosin-Spiegel stimuliert die koronare Durchblutung, welche normalerweise zu einem Ausgleich des Energiedefizits oder der Anoxie führt.
Das Verhältnis zwischen der Menge von AD in Herzgewebe, Serum und Erythrocyten, und der Menge von Adenosin, die aus dem Herzen durch das Blut heraustransportiert wird, bestimmt die Dauer und die Intensität des Adenosin-Effektes. Obwohl der AD-Spiegel in Plasma und Erythrocyten relativ niedrig ist, gewährleistet das große Blutvolumen, das durch die Coronarien fließt, einen ausreichenden Desaminierungsmechanismus.

Die vasodilatatorische Aktivität von Adenosin besteht also nur vorübergehend. Durch die rasche Desaminierung zu Inosin wird sie aufgehoben (26-3o). Einige Adenosin-Analoge (z.B. N^6-Methyladenosin, 6-Methoxypurinribonucleosid) dienen als kompetitive Inhibitoren von Herz- und Erythrocyten-AD (29).

2. Die Rolle bei der DNS-Synthese

Vergleichende Untersuchungen der AD-Aktivitäten in einigen Organen der Ratte zeigten, daß in Geweben mit hoher DNS-Synthese und großer mitotischer Aktivität - während der Regeneration normaler oder der Proliferation neoplastischer Gewebe - diese Enzymkonzentrationen stark erhöht sind (33). Eine Erhöhung der zellulären AD-Konzentration ist wahrscheinlich für die DNS-Synthese notwendig. Dies steht auch in Einklang mit der Beobachtung, daß die Anhäufung von Adenosin das Eintreten der Zelle in die Prophase verhindert (34). Die Faktoren, welche die DNS-Synthese kontrollieren, scheinen also auch mit den Kontrollmechanismen der Mitose eng zusammenzuhängen. Man weiß, daß Desoxyadenosin die DNS-Synthese in EHRLICH'schen Asciteszellen stark hemmt. Diese Hemmung ist mit der Reduktion von Guanylsäure (GMP) in Desoxyguanylsäure (dGMP) verbunden (35, 36). Ebenso konnte man nachweisen, daß Extrakte aus Hühnerembryonen die Reduktion von Ribonucleotiden in Desoxyribonucleotide, also Bausteine der DNS, katalysieren und daß ein Gleichgewicht zwischen den Phasen der Reduktion und denen der Polymerisation der Desoxyribonucleotidphosphate besteht. Die Reduktion von Cytidylsäure (CMP) in Desoxycytidylsäure (dCMP) und von GMP in dGMP wird durch sehr schwache Konzentrationen von d-GTP und d-ATP gehemmt. Man nahm deshalb an, daß dieser inhibitorische Effekt ein wichtiger

Faktor in der Regulation der DNS-Synthese sei.

In gleicher Weise läßt sich das Verhalten der Desoxy-Adenosin-Desaminase (dAD) in den Zellen mit großer mitotischer Aktivität erklären:

d-AD verhindert die Anhäufung von Desoxyadenosin und hält so die Bildung von d-ATP auf einem für die DNS-Synthese erforderlichen Minimum. In mitotisch inaktiven Zellen ist d-AD nur in schwacher Konzentration vorhanden und bewahrt so Desoxyadenosin (und d-ATP) in einer, die DNS-Synthese und folglich die Zellteilung, hemmenden Menge.

Nach diesen Ergebnissen kann man annehmen, daß die AD im Zellstoffwechsel eng mit den Regulationsmechanismen der DNS-Synthese verbunden ist.

3. Bedeutung für die Klinik

Die Ergebnisse der oben erwähnten Untersuchungen (33) stehen in vollem Einklang mit vielen Beobachtungen in der Klinik.

Der Enzymspiegel im Serum nimmt bei Patienten mit verschiedenen Arten maligner Tumoren zu.

Die AD-Aktivität in der normalen Leber ist niedrig (37, 38), in Tumorgeweben dagegen bedeutend höher (39-41). Die Erhöhung der AD-Aktivität im Serum geht parallel mit dem Schädigungsgrad der Leber (42).

In einer Untersuchungsreihe war bei 75 % der Patienten mit bösartigen Tumoren und Leberparenchymschädigung die AD-Aktivität um ungefähr das Dreifache erhöht (42).

Bei Ikterus, verursacht durch gutartigen Verschluß der Gallenwege, wurde bei nur 2o % der Untersuchten eine geringe AD-Aktivitätserhöhung festgestellt (42).

Hohe AD-Spiegel im Serum wurden bei Virushepatitis (43), infektiöser Mononucleosis (41, 43) und Leberzirrhose (43) gefunden. Die AD-Aktivität im Serum ist weniger bei Verschlußikterus als bei Virushepatitis erhöht (43). Daher ist die Bestimmung der AD-Aktivität bei der Differentialdiagnose von Ikteruspatienten wertvoll.

Frühzeitige und sehr beachtliche Anstiege der AD-Werte wurden im Serum bei Typhus-Patienten beobachtet (43).

Patienten mit anderen infektiösen oder nicht infektiösen, von hohem Fieber begleiteten Krankheiten zeigten leichte oder mäßige Zunahme der AD-Aktivität im Serum (44). Bei akuten Leberkrankheiten und akuten Infektionen fanden sich auch erhöhte Werte der Desoxycytidylat-Desaminase (d-CMPD) im Serum. Die Enzymaktivitäten waren eng mit dem Krankheitsgrad verbunden. Erhöhungen der d-CMPD wurden ebenfalls bei Lupus erythematodes und in etwas geringerem Ausmaß bei rheumatoider Arthritis und anderen Kollagenkrankheiten festgestellt. Bei etwa 50 % der Patienten mit malignen Tumoren waren die Serumwerte erhöht (45).

Die Einwirkung bestimmter Gifte kann den Anstieg von AD- und AMPD-Aktivitäten bewirken. So führte beispielsweise bei Ratten die intraperitoneale Injektion des Isopropylesters der Methylfluorphosphonsäure (Sarin) innerhalb weniger Minuten zum Anstieg von AD-Aktivitäten im Herz- und Skelett-Muskel (51).

4. Die subzelluläre Verteilung der Adenosin-desaminase

		Adenosin-desaminase (AD)	
Species	Organ	Subzelluläre Verteilung	Lit.
Ratte	Leber	ausschließlich im cytoplasmatischen Überstand	55 58
Ratte	Gehirn		59
Huhn (34 Wochen alt)	Leber		6o
Kaninchen	Gehirn (weiße Substanz)		61
Maus	Leber	Cytoplasmatische Fraktion: 9o % (Überstand 15oooo g/ 3o') einzelne Fraktionen nicht untersucht	56
Maus	Leber Milz	signifikante Aktivität in partikulären Zellanteilen nachgewiesen	54
Rind	Mucosa	Cytoplasma, z.T. Kern	62
Kalb	Thymus	Vorkommen im Zellkern	62 64
Pferd Kalb	Leber Thymus Herz	hohe Aktivität im Zellkern	63

Adenosin-desaminase (AD)			
Species	Organ	Subzelluläre Verteilung	Lit.
Kaninchen	Myocard	nachweisbare Aktivität in der Mikrosomenfraktion (75ooo g)	65
Kaninchen	Gehirn	höchste Aktivität in der cytoplasmatischen Fraktion, geringe Aktivitäten in den Sedimentfraktionen nachweisbar	66
Kaninchen	Gehirn	Kernfraktion 1o,1% höchste spezifische Aktivität.	
		Mitochondrienfraktion 9,5% niedrigste spezifische Aktivität	
		Zelltrümmer (Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen) 32,2%	57
		Cytoplasmatische Fraktion.	
		- Überstand 23ooo g/3o' 65,3%	
		- Überstand 14oooo g/ 1-1,5 h 96-98%	

		Adenosin-desaminase (AD)		
Species	Organ	Subzelluläre Verteilung		Lit.
Maus	Gehirn	Kernfraktion (700g/10') und Mitochondrienfraktion (15000 g/60')	vernachlässigbare Aktivität. (Bei Behandlung mit Triton X-100 jedoch: signifikante Aktivität nachweisbar)	54
		Mitochondrien Überstand (15000 g/30')	größter Teil der Aktivität	

II. Adenylatdesaminase:

Vorkommen, physiologische Bedeutung und subzelluläre Verteilung

(AMPD, AMP-aminohydrolase, EC 3.5.4.6.)

AMPD katalysiert die hydrolytische Desaminierung von AMP zu IMP und NH_3. Das Molekulargewicht wurde aus Kaninchenmuskel nach der Sedimentations-Diffusionsmethode mit ca. 270 000 angegeben (12).

Das Enzym ist in tierischen Geweben weitverbreitet.

Im Skelettmuskel jedoch ist die AMPD-Aktivität sehr viel höher als in anderen Geweben einschließlich Herzmuskulatur und glatter Muskulatur (46). Die Verteilung des Enzyms im Skelettmuskel variiert zum großen Teil; weiße Muskeln haben höhere Enzymkonzentrationen als rote (47).

Durch bestimmte Gifte sind Erhöhungen der Enzymaktivität möglich. So hatte die orale oder intravenöse Applikation von Hepatocarcinogenen (3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol, Thioacetamid) einen Anstieg der AMPD-Aktivität der Leber im Sinne einer Enzyminduktion zur Folge (52).

Mit hochgereinigter AMPD aus Kalbshirn wurde ein Regelmechanismus für die Desaminierung von AMP gefunden, der durch ATP und Alkaliionen als Aktivatoren und GTP als Inhibitoren gewährleistet ist. Dadurch wurde dem Enzym eine steuernde Rolle für die Einstellung der intrazellulären Reaktionen von Adenin- und Guaninnucleotiden zugeschrieben (31, 48).

Die AMPD kann auch durch Ascorbinsäure beeinflußt werden. Untersuchungen der AMPD der Zytoplasmafraktion des Rattenhirns ergaben:

In Anwesenheit von ATP wirkt Ascorbinsäure von einer bestimmten Konzentration an als Inhibitor der AMPD.

In Gegenwart äquimolarer Mengen AMP und ATP wird dieser Hemmeffekt aufgehoben. Es wird angenommen, daß Ascorbinsäure in analoger Weise wie ATP und GTP als allosterischer Faktor wirksam ist, aber auch den Redoxzustand des Enzyms beeinflussen kann (48).

Anorganisches Phosphat hemmt AMPD völlig. Kreatinphosphat ist ebenfalls ein Inhibitor. Es wurde vermutet, daß die AMPD im ruhenden Muskel teilweise oder völlig gehemmt ist. Wenn sich im Muskel ADP anreichert, hebt dies die durch Nucleosidtriphosphate, anorganisches Phosphat und Kreatinphosphat verursachte Hemmung auf, wobei das Enzym reaktiviert wird (46).

Die verschiedenen Untersuchungsergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, daß AMPD ein allosterisches Enzym ist, und daß seine subzelluläre Regulierung wahrscheinlich durch das Verhältnis von AMP-ATP-GTP erfolgt (48).

Für das AMPD-Molekül des Gehirns wurde folgendes Modell vorgeschlagen:

Das Molekül hat mindestens drei verschiedene funktionelle Wirkungsgruppen. Die erste Gruppe bindet das Substrat und ist verantwortlich für die katalytische Funktion des Enzyms. Die beiden anderen Gruppen binden ATP und das Alkalimetallion und stellen die "allosterische Gruppe" des Enzyms dar. Diese sind verantwortlich für die Regulierung der katalytischen Aktivität (49).

Obwohl GTP die Aktivität der AMPD in Abwesenheit von ATP ändert, liegt

sein Haupteffekt in der Hemmung des ATP. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, daß eine separate Bindestelle für GTP existiert (5o).

Die subzelluläre Verteilung der Adenylatdesaminase

		Adenylatdesaminase (AMPD)	
Species	Organ	Subzelluläre Verteilung	Lit.
Ratte	Leber	in cytoplasmatischer Fraktion (Überstand 1o5ooo g) Aktivität nachgewiesen	52
Ratte	Gehirn	hohe Aktivität in cytoplasmatischer Fraktion	48
Ratte	Leber	Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion zusammen: nachweisbare AMPD- und d-AMPD-Aktivität	58
Ratte	Milz	Mitochondrien und cytioplasmatische Fraktion	ZOCH
Ratte	Skelett-muskel	nach steigenden Aktivitäten: Kern-, Mitochondrien-, Cytoplasma- u.Mikrosomenfraktion	ZOCH unveröff. Untersuchungen
Ratte	Niere	überwiegend in der cytoplasmatischen Fraktion	ZOCH unveröff. Unters.
Kaninchen	Myocard	in Mikrosomenfraktion (18ooo-1o5ooog) nachweisbare Aktivität	65 67 68
Kaninchen	Skelett-muskel	höchste Aktivität in Mikrosomenfraktion	69
Kaninchen	Gehirn (weiße Substanz)	Mitochondrien- 4o% fraktion cytoplasma- 45% Aktivität tische Fraktion	61

B. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON NUCLEOSID- UND NUCLEOTID-DESAMINASEN IN MENSCHLICHEM PLACENTA- UND FRUCHTSACKGEWEBE

I. Fragestellung

Ein Organ mit einer so großen Wachstumspotenz und so vielfältigen synthetischen Leistungen und Transportfunktionen wie die menschliche Placenta weist zweifellos einen erheblichen Nucleosid- und Nucleotid-umsatz auf, der in erster Linie von den entsprechenden Desaminasen mitgesteuert wird. Deshalb ist es von Bedeutung, zunächst die Aktivitäten der Nucleosid- bzw. Nucleotid-Desaminasen und deren subzelluläre Verteilung im Placentagewebe sowie im Fruchtsack[1] zu ermitteln, bevor Untersuchungen über den Mechanismus dieser Steuerungsvorgänge unternommen werden. Im Hinblick auf die subzelluläre Enzymverteilung in menschlicher Placenta ist bisher kaum Literatur verfügbar.

---

[1] Fruchtsack:
Von Fruchtwasser erfüllter Sack, in dem der Keimling geborgen ist. Die Wand des Fruchtsacks besteht zum kleineren Teil aus der Placenta, zum größeren Teil aus:
1. den verklebten Eihäuten (Chorion und Amnion)
2. der mit den Eihäuten verklebten Decidua capsularis
3. der mit der Decidua capsularis verklebten Decidua parietalis.
Alle Verklebungen sind fest, so daß die Wand ein einheitliches Gebilde darstellt (76).

Über den Purin- und Pyrimidin-nucleotid-Stoffwechsel der Humanplacenta liegen einige Teilergebnisse und Vermutungen vor, die jedoch bestätigt und erweitert werden müssen (71-73). Vom menschlichen Fruchtsack sind in dieser Hinsicht überhaupt keine Ergebnisse bekannt.

Die experimentelle Fragestellung soll demnach zwei Gesichtspunkte umfassen:

1. Die subzelluläre Verteilung von AD, AMPD und CMPD in menschlicher Placenta und Fruchtsack.

2. Die Abbauwege von Adenosin, AMP und CMP in den verschiedenen subzellulären Fraktionen von menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe.

II. Methodik

Übersicht:

1. Zellfraktionierung
2. Bestimmung des Eiweißgehaltes der einzelnen Fraktionen (KJELDAHL-Methode)
3. Messung der Desaminasen-Aktivitäten nach der pH-Stat-Methode
4. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Desaminierung
5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

1. Zellfraktionierung

Es wurden insgesamt 15 reife Term-Placenten und Fruchtsäcke unmittelbar nach der Geburt unter ständiger Kühlung bei ca. $+4^{\circ}$ C wie folgt verarbeitet:

Placenta:

Von der maternen Seite der Placenta her wurden kirschgroße Gewebsstückchen herausgeschnitten, mehrmals in o,25 M Saccharoselösung gewaschen und durch Auspressen auf Filterpapier so weit wie möglich blutfrei gemacht. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach dem unten angegebenen Schema.

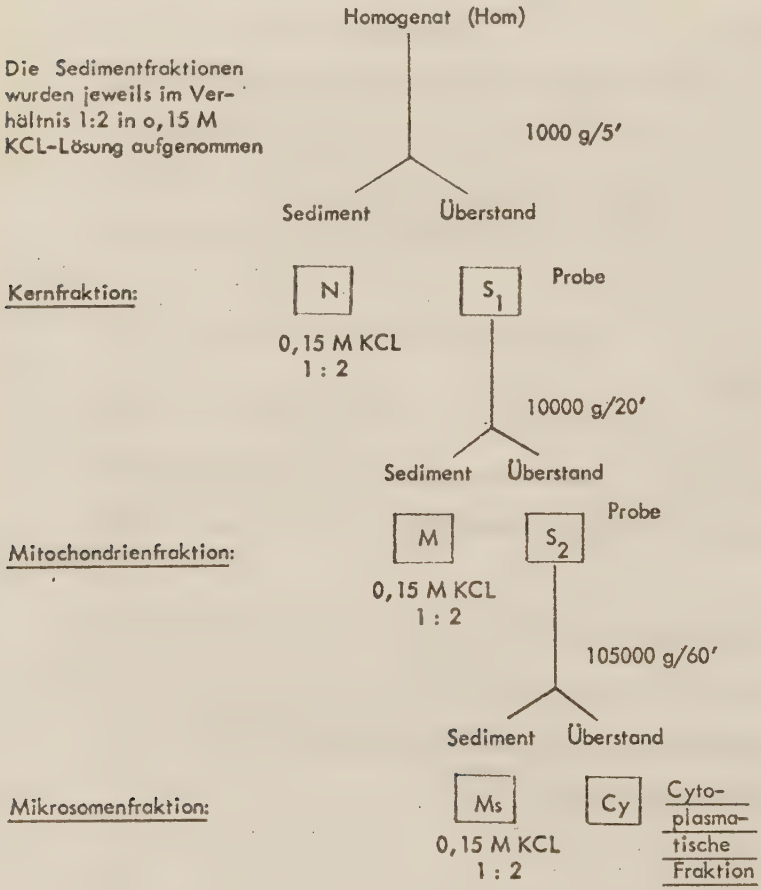
Fruchtsack:

Der gesamte Fruchtsack (uteriner und foetaler Anteil) wurde in briefmarkengroße Teile zerschnitten, in o,25 M Saccharoselösung mehrmals gewaschen und durch Abtupfen auf Filterpapier von Blutresten befreit.

Der größte Teil der Gewebsproben wurde sofort verarbeitet, ein kleinerer Teil hiervon tiefgefroren und innerhalb von 14 Tagen (nach Auftauen bei Zimmertemperatur) weiter verarbeitet. Es zeigte sich hierbei kein Unterschied in den Ergebnissen.

Aufarbeitungsschema der Zellfraktionierung:

Die Gewebeteile wurden im Verhältnis 1 : 4 in o,25 M Saccharose-Lösung aufgenommen und bei ständiger Kühlung mit Eiswasser je 30 Sekunden im Messerhomogenisator und im POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator homogenisiert.



Die Bezeichnungen "Kernfraktion", "Mitochondrienfraktion", "Mikrosomenfraktion" und "cytoplasmatische Fraktion" beruhen auf allgemein vereinbarten Sedimentationsmustern der differenzierten Zentrifugation von Homogenaten (54).

Die Mikrosomenfraktion stellt eine heterogene Fraktion verschiedener subzellulärer Partikel aus endoplasmatischem Reticulum, Lysosomen, Ribosomen und Golgi-Apparat dar.

2. Bestimmung des Eiweißgehaltes der einzelnen Fraktionen

(KJELDAHL-Methode)

Die Bestimmung wurde nach folgender Arbeitsvorschrift durchgeführt:

Zur Fällung der Eiweißkörper werden jeweils o,5 ml Extrakt mit 4,o ml 2o %iger Trichloressigsäure versetzt und 5 Min. bei 3ooo U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment erneut mit 4,o ml 2o %iger Trichloressigsäure behandelt und nochmals 5 Min. bei 3ooo U/Min. zentrifugiert. Die gesammelten Rückstände werden mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure, einem Tropfen Kupfersulfat-Lösung und einer Spatelspitze Kaliumsulfat naß verascht. Der Protein-N wird dabei in Ammoniumsulfat überführt. Im Mikro-Kjeldahl-Apparat wird durch Zugabe eines Laugenüberschusses das NH_4^+-Ion als

Ammoniak mittels Wasserdampfdestillation quantitativ ausgetrieben und in einer Vorlage aufgefangen, in der sich 1o ml Borsäure und Tashiro-Indikator befinden. Nach 5 minütiger Destillation läßt sich das in der Borsäure-Falle aufgefangene Ammoniak azidimetrisch mit o,o1 N HCL bis zum Farbumschlag des Tashiro-Indikators titrieren.

Berechnung des Eiweißgehaltes (EW)

Die Berechnung bezieht sich auf jeweils o,5 ml Extrakt.

N-Gehalt:

$n \cdot o,14$ mg N/Analyse (o,5 ml) (n = verbrauchte ml o,o1 N HCL)

$= n \cdot o,14 \cdot 2 \cdot 1o^{2}$ mg N /1oo ml Extrakt

$= n \cdot 28$ mg N/1oo ml Extrakt

$= n \cdot 28 \cdot 1o^{-3}$ g N/1oo ml Extrakt

$= n \cdot 2,8 \cdot 1o^{-2}$ g% N

Eiweiß-Gehalt:

$n \cdot 2,8 \cdot 1o^{-2} \cdot 6,25 = n \cdot 17,5 \cdot 1o^{-2}$ g/1oo ml

$= n \cdot 17,5 \cdot 1o^{-2}$ g %

$= n \cdot o,175$ g %

Für jede untersuchte Fraktion wurde jeweils eine Doppelbestimmung vorgenommen.

3. Messung der Desaminasen-Aktivitäten nach der pH-Stat-Methode

Die Desaminasen-Aktivitäten in den einzelnen Homogenaten sowie in den verschiedenen subzellulären Fraktionen werden nach der pH-Stat-Methode (E. ZOCH, unveröffentlicht) quantitativ untersucht. Das bei der Desaminierung freigesetzte Ammoniak bewirkt eine Erhöhung des pH-Wertes, die automatisch mit verdünnter HCl auf das ursprünglich eingestellte pH zurücktitriert wird. Die selbsttätige Aufzeichnung der fortlaufend verbrauchten ml Säure in Funktion der Zeit in Minuten ergibt die Zeit-Umsatzkurve, aus der sich die Desaminasen-Aktivität berechnen läßt. Die Bestimmungen werden mit Hilfe des Combititrators 3 D der Firma Metrohm AG, Herisau (Schweiz) durchgeführt, der aus dem pH-Meter E 300 B mit kombinierter Mikro-Kugelelektrode EH 147, dem Impulsomaten E 373 und dem Mikrodosigraphen E 425-1 für Mikrotitrationen mit einem 1 ml Reaktionsgefäß besteht. Im Reaktionsgefäß werden 1 ml H_2O (dest.) und jeweils 30 µMol Substrat bei 37° C inkubiert, wobei das pH-Meter auf pH 7,4 eingestellt wird. Nach Zugabe von 0,2 ml des betreffenden Extraktes wird die enzymatische Reaktion gestartet. Die Titration des Ammoniaks mit 0,025 N HCl erfolgt automatisch durch den Impulsomaten. Der Dosigraph als registrierende Bürette zeichnet den Säureverbrauch in Funktion der Zeit selbsttätig auf. Die pH-Messung erfolgt mit einer Ansprechempfindlichkeit von 0,01 pH und einer Genauigkeit bis 0,01 pH.

Die Zeit-Umsatzkurven werden aufgezeichnet:

Vollversuch

Inkubation von Substrat und Extrakt

Kontrollversuche

1. Eigenverhalten des Substrats (ohne Extrakt)

2. Eigenverhalten des Extraktes (ohne Substrat)

Die Enzymaktivität ergibt sich aus:

Vollversuch - Kontrollversuch (1 + 2)

Berechnung der Desaminasen-Aktivität

Aus der Zeit-Umsatzkurve wird der Verbrauch an o,o25 N HCl in µl/min. entnommen. Daraus errechnet sich der Substratumsatz/min (Einheit der Enzymaktivität) wie folgt:

n 2,5 $1o^{-2}$ µMol Substrat/min

=n 2,5 1o nMol Substrat/min

Spezifische Aktivität: $\frac{\text{nMol Substrat / min}}{\text{mg Protein in o,2 ml Extrakt}}$

also: $\frac{n \quad 25}{2 \quad a}$ nMol / min / mg (a = g % Protein)

4. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Desaminierung

Der qualitative Nachweis der Desaminasenaktivität der einzelnen subzellulären Fraktionen, die nach dem pH-Stat-Verfahren quantitativ untersucht wurden, erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf DC-Alufolie Cellulose Merck - ohne Fluoreszensindikator - 5563/0001. Als Fließmittel (F) wurden folgende Gemische verwendet:

F_1 :	n Butanol:	Aceton:	Essigsäure:	NH_3 (5 %):	H_2O
	3,5 :	2,5 :	1,5 :	1,5 :	1

F_2 :	gesättigte Ammoniumsulfatlösung:	1M Natriumacetatlösung:	Isopropanol:
	4o :	9 :	1

Auftragung: 5 µl Inkubat

Laufzeit: in F_1 : ca. 6 Stunden

in F_2 : ca. 5 Stunden

Entwicklung: im UV-Licht (λ = 254 nm) waren die hier verwendeten Substrate und die gebildeten Produkte als dunkle Flecke gut zu erkennen.

Vorgang: o,25 ml Gewebsextrakt wurde mit o,25 ml Substrat (z.B. Adenosin) bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert.

Die Substratkonzentration betrug 5o uMol / ml Phosphatpuffer pH 7,4.

Nach bestimmten Zeiten wurden jeweils 5 ul des Reaktionsgemisches mit einer Eppendorf-Pipette auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und sofort mit einem Fön getrocknet, d.h. die Reaktion wurde gestoppt.
Nach dem Trennungsvorgang und Trocknen der Platten wurden die Substanzflecken bei UV-Licht mit Bleistift umfahren und so für die weitere Auswertung und Dokumentation sichtbar gemacht.

Die Identifizierung der gebildeten Produkte erfolgte mit Hilfe von Testchromatogrammen sowie nach Elution der Substanzen mittels spektrophotometrischer Messungen.

5. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Von den jeweils 15 Messwerten (Anzahl der untersuchten Placenten) wurde der arithmetische Mittelwert $\overline{X}$ gebildet:

$$\overline{X} = \frac{Xn}{n}$$

Die Standardabweichung SD (Standard Deviation, Streuung, mittlerer Fehler), die angibt, wie stark die Einzelwerte um den Mittelwert streuen, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma\ Xn^2}{n-1} - \frac{(\Sigma\ Xn)^2}{n\,(n-1)}}$$

n: Zahl der Versuche

$\Sigma\ Xn^2$: Summe der Quadrate der Einzelwerte X_1, X_2 .....

$(\Sigma Xn)^2$: Summe der Einzelwerte X_1, X_2 ..... zum Quadrat.

Der Variationskoeffizient oder die Fehlerbreite V gibt ein relatives Maß für die Streuung . In V sind enthalten:

a) die Streuung des Versuchsmaterials (individuelle Schwankungen, physiologischer Streubereich);

b) die Streuung (Fehler) der Bestimmungsmethoden (Arbeits- und Meßfehler, subjektive Fehler u.a.)

$$V\ \left[\%\right] = \frac{SD}{\bar{X}}\ .\ 100$$

In der Tabelle der Versuchsergebnisse sind jeweils die Mittelwerte angegeben, in Klammern die Standardabweichung.

Für die spezifische Aktivität, die zum Vergleich der verschiedenen Desaminasen-Aktivitäten der einzelnen Fraktionen herangezogen wurde, wird zusätzlich jeweils der Variationskoeffizient angegeben.

V-Werte von über 3o % bedeuten eine starke Uneinheitlichkeit (Streuung)

der Kollektive (große Heterogenität des Untersuchungsmaterials).

III. Darstellung der Ergebnisse

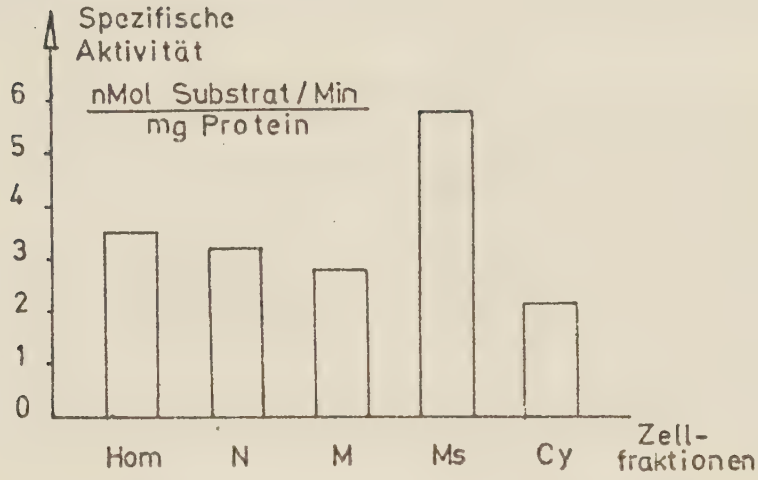
1. Subzelluläre Verteilung

Die subzelluläre Verteilung der Desaminase-Aktivitäten in Bezug auf 2' - Desoxyadenosin, 2', 3'-Isopropylidenadenosin, AMP-5'-Na_2, CMP-5'-Na_2 und Cytidin in der menschlichen Placenta,

Substrat: Adenosin

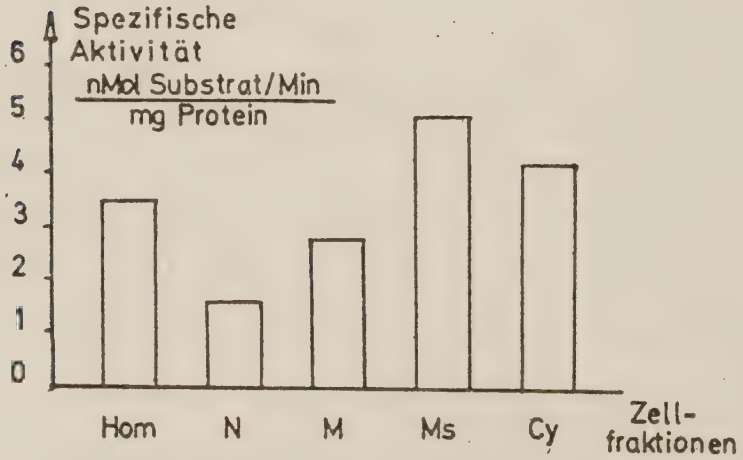
Zell-fraktion	nMol min	SD ±	EW-Gehalt (g%)	SD ±	nMol min·mg	SD ±	V (%)
Hom	1o	2,5	1,42	o,3	3,5	1,2	34
N	7,5	2,4	1,17	o,3	3,2	1,1	34
M	5,o	2,3	o,89	o,2	2,8	o,8	28
Ms	2o	4,5	1,72	o,4	5,8	1,2	21
Cy	2,5	o,9	o,6o	o,2		2,1	29

Substrat: Adenosin



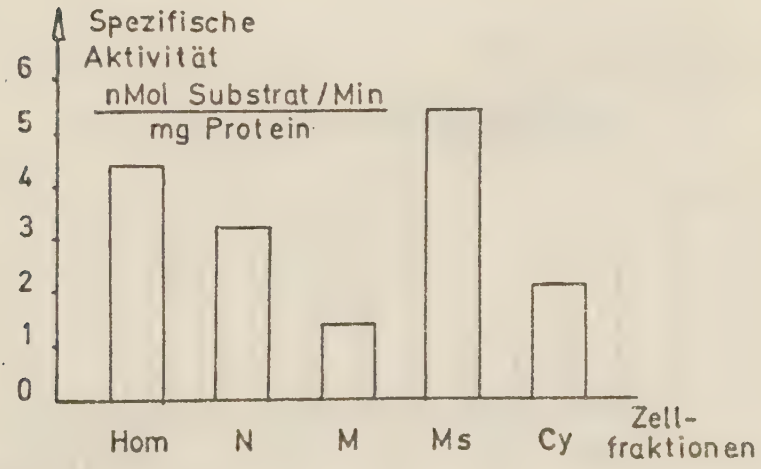
Substrat: 2'-Desoxyadenosin

Zell-Fraktion	nMol/min	SD ±	EW-Gehalt (g%)	SD ±	nMol/min·mg	SD ±	V (%)
Hom	1o	2,4	1,42	o,3	3,5	1,3	37
N	3,8	1,2	1,17	o,3	1,6	o,4	25
M	5,o	1,9	o,89	o,2	2,8	1,o	35
Ms	18,2	4,2	1,72	o,4	5,1	1,3	25
Cy	5,o	2,4	o,6o	o,2	4,2	1,2	27



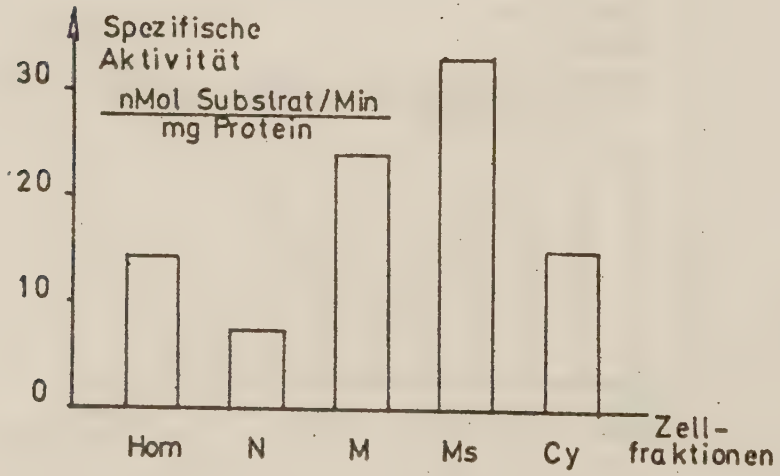
Substrat: 2',3'-Isopropyliden-Adenosin

Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min · mg	SD ±	V (%)
Hom	12,5	2,6	1,42	o,3	4,4	1,4	32
N	7,5	2,1	1,17	o,3	3,2	1,2	37
M	2,5	1,4	o,89	o,2	1,4	o,6	43
Ms	19,1	5,1	1,72	o,4	5,4	1,4	26
Cy	2,5	1,5	o,6o	o,2	2,1	o,7	33



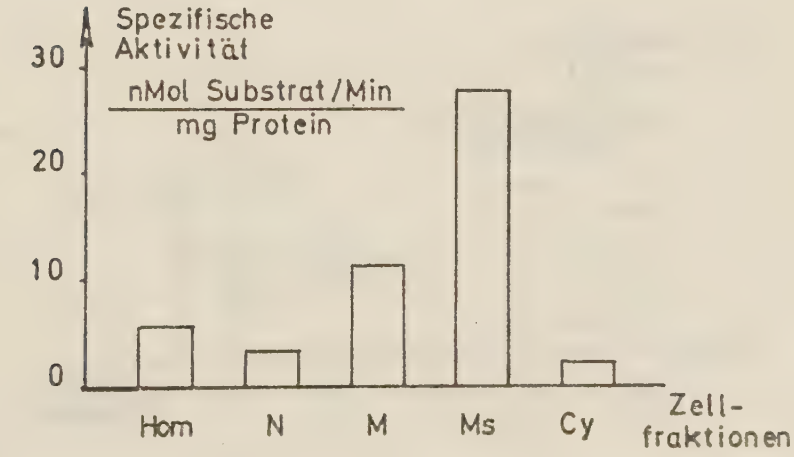
Substrat: AMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min*mg	SD ±	V (%)
Hom	4o	8,9	1,42	o,3	14,1	3,9	28
N	17,5	4,3	1,17	o,3	7,5	2,1	28
M	42,5	9,3	o,89	o,2	23,9	5,2	22
Ms	112,5	25,8	1,72	o,4	32,8	6,7	24
Cy	17,5	4,5	o,6o	o,2	14,7	3,8	26



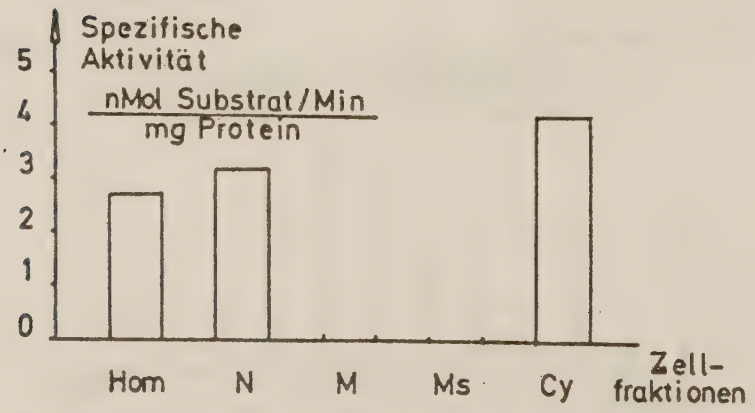
Substrat: $CMP\text{-}5'\text{-}Na_2$

Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min · mg	SD ±	V (%)
Hom	15	4,7	1,42	o,3	5, 3	1,9	35
N	7,5	2,3	1,17	o,3	3,2	o,9	28
M	2o	3,9	o,89	o,2	11,2	2,8	25
Ms	95	24	1,72	o,4	27,7	5,8	25
Cy	2,5	o,9	o,6o	o,2	2,1	o,5	24



Substrat: Cytidin (hemisulfat)

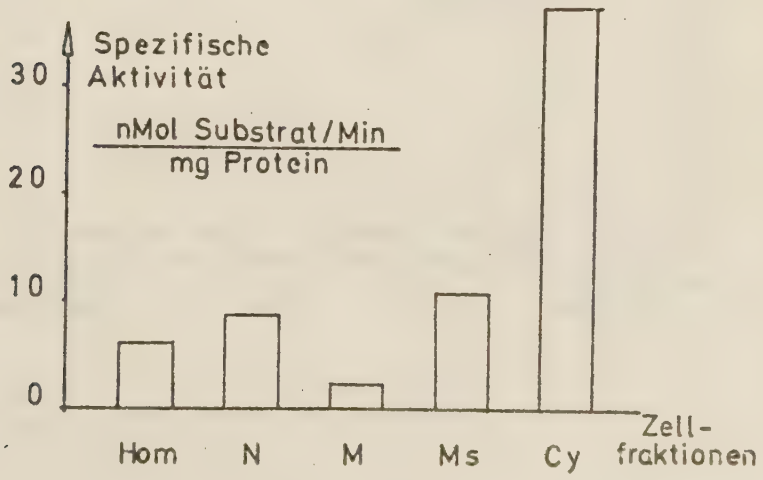
Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min · mg	SD ±	V (%)
Hom	7,5	2,4	1,42	o,3	2,7	o,8	29
N	7,5	2,3	1,17	o,3	3,2	o,9	28
M	o	o	o,89	o,2	o	o	o
Ms	o	o	1,72	o,4	o	o	o
Cy	5,o	1,4	o,6o	o,2	4,2	1,3	31



Die subzelluläre Verteilung der Desaminasen-Aktivitäten von Adenosin, AMP-5'-Na_2 und CMP-5'-Na_2 im menschlichen Fruchtsack.

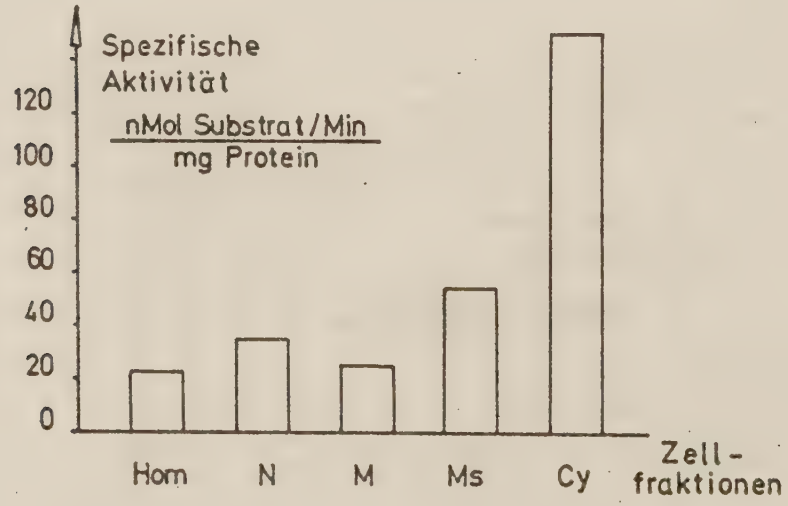
Substrat: Adenosin

Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min · mg	SD ±	V (%)
Hom	18	4,2	1,5	o,4	6,o	2,1	35
N	1o	2,4	o,57	o,2	8,8	2,5	28
M	5	1,2	1,o9	o,3	2,3	o,8	35
Ms	22,5	4,7	1,o3	o,2	1o,9	2,3	21
Cy	15	3,2	o,2o	o,1	37,5	9,7	26



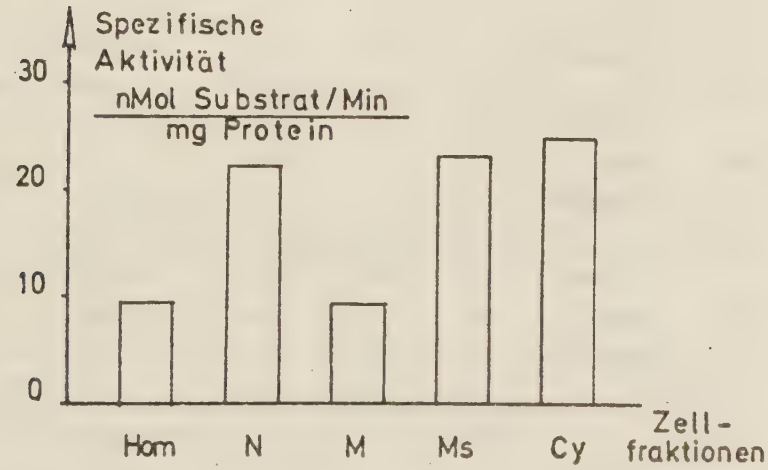
Substrat: AMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min * mg	SD +	V (%)
Hom	69,4	12,3	1,5	o,4	23,1	4,9	21
N	4o	11,2	o,57	o,2	35,5	8,7	25
M	52,5	11,4	1,o9	o,3	24,2	5,6	23
Ms	115	24,8	1,o3	o,2	55,8	14,7	26
Cy	6o	12,3	o,2o	o,1	15o	41,2	27



Substrat: CMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	n Mol / min	SD ±	EW-Gehalt (g %)	SD ±	n Mol / min · mg	SD ±	V (%)
Hom	27,4	4,3	1,5	o,4	9,1	2,8	31
N	25	4,2	o,57	o,2	22,1	5,3	24
M	2o	4,3	1,o9	o,3	9,2	2,7	29
Ms	47,5	9,8	1,o3	o,2	23,1	6,2	26
Cy	1o	2,7	o,2	o,1	25,o	6,7	27



2. Der Abbau von Purin und Pyrimidin-Nucleotiden in subzellulären Fraktionen menschlichen Placenta- und Fruchtsackgewebes

Der Abbau von Adenosin, AMP, CMP in menschlicher Placenta

Substrat: Adenosin

Zell-fraktion	Produkte	Dünnschichtchromatographisch nachgewiesene Produkte nach verschiedenen Inkubationszeiten.				
		3′	1o′	3o′	6o′	12h
Hom	Adenosin	+++	++	++	++	o
	Inosin	(+)	+	++	++	o
	Hypoxanthin	o	o	(+)	++	+++
N M	Adenosin	+++	++	++	++	o
	Inosin	(+)	+	++	++	o
	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
Ms	Adenosin	+++	++	++	++	o
	Inosin	+	+	++	++	o
	Hypoxanthin	(+)	+	+	++	+++
Cy	Adenosin	+++	++	++	++	o
	Inosin	(+)	+	++	++	o
	Hypoxanthin	o	o	(+)	+	+++

Zeichenerklärung:

+++ hohe Konzentration
++ mittlere Konzentration
+ geringe Konzentration
(+) Spuren
o kein Vorliegen

Substrat: AMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	Produkte	Dünnschichtchromatographisch nachgewiesene Produkte nach verschiedenen Inkubationszeiten				
		3'	10'	30'	60'	12h
Hom	Adenosin	(+)	+	++	+	o
	Inosin	(+)	+	+	++	o
	AMP	+++	++	+	(+)	o
	IMP	(+)	+	+	+	o
	Hypoxanthin	o	o	(+)	+	+++
N	Adenosin	(+)	+	++	+	o
	Inosin	(+)	+	+	++	o
	AMP	+++	++	+	(+)	o
	IMP	(+)	+	+	+	o
M	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
	Adenosin	(+)	+	++	+	o
	Inosin	(+)	+	+	+++	o
	AMP	+++	++	+	(+)	o
Ms	IMP	+	+	++	(+)	o
	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
	Adenosin	(+)	+	++	+	o
	Inosin	(+)	+	+	++	o
Cy	AMP	+++	++	+	(+)	o
	IMP	(+)	+	++	+	o
	Hypoxanthin	o	o	(+)	+	+++

Substrat: CMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	Produkte	Dünnschichtchromatographisch nachgewiesene Produkte nach verschiedenen Inkubationszeiten			
		3'	1o'	3o'	6o'
Hom, Cy, N, M	CMP + UMP	+++	++	+	o
	Cytidin + Uridin	(+)	+	++	+++
Ms	CMP + UMP	+++	+	+	o
	Cytidin + Uridin	+	++	++	+++

Der Abbau von Adenosin im menschlichen Fruchtsack

Substrat: Adenosin

Zell-fraktion	Produkte	Dünnschichtchromatographisch nachgewiesene Produkte nach verschiedenen Inkubationszeiten				
		10′	20′	30′	45′	60′
Hom, N, M	Adenosin	+++	++	+	o	o
	Inosin	(+)	+	++	+	o
	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
Ms	Adenosin	+++	++	+	o	o
	Inosin	+	+	++	+	o
	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
Cy	Adenosin	++	+	+	o	o
	Inosin	++	+++	++	+	o
	Hypoxanthin	o	o	+	++	+++

Substrat: AMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	Produkte	Dünnschichtchromatographisch nachgewiesene Produkte nach verschiedenen Inkubationszeiten				
		10'	20'	30'	60'	12h
Hom, N M	Adenosin	+	+	+	+	(+)
	Inosin	+	+	+	+	+
	AMP	+++	++	+	+	o
	IMP	(+)	+	+	+	o
	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
Ms	Adenosin	+	+	+	+	(+)
	Inosin	+	+	+	+	+
	AMP	+++	++	+	+	o
	IMP	+	++	+	+	o
	Hypoxanthin	o	(+)	+	++	+++
Cy	Adenosin	+	+	+	+	o
	Inosin	+	+	+	+	+
	AMP	+++	++	++	+	o
	IMP	++	+++	++	+	o
	Hypoxanthin	o	o	+	+	+++

Substrat: CMP-5'-Na_2

Zell-fraktion	Produkte	Dünnschichtchromatographisch nachgewiesene Produkte nach verschiedenen Inkubationszeiten			
		10'	30'	60'	2h
Hom, M	CMP + UMP	+++	++	+	o
	Cytidin + Uridin	(+)	+	++	+++
N, Ms	CMP + UMP	++	+	o	o
	Cytidin + Uridin	+	++	+++	+++
Cy	CMP + UMP	+	+	o	o
	Cytidin + Uridin	++	++	+++	+++

IV. Diskussion

1. Diskussion der Methodik

Untersuchungsmaterial

Es wurden 15 reife Term-Placenten überwiegend gesunder Mütter verarbeitet. In drei Fällen erfolgte die Geburt vier Wochen vor dem errechneten Termin, in zwei Fällen wurde eine Sectio caesarea wegen der Rh-Situation durchgeführt, in vier Fällen waren die Neugeborenen leicht asphyktisch. Bei keiner der Mütter war ein maligner Tumor oder eine andere schwerwiegende Krankheit bekannt. In jedem Falle war die Placenta vollständig vom Uterus gelöst und keine zeigte irgendwelche makroskopisch erkennbaren pathologischen Veränderungen oder Besonderheiten.
Von dieser Seite ist kein Einfluß auf die Ergebnisse zu erwarten, da selbst bei Extrakten aus toxinämischen Placenten die enzymatischen Aktivitäten denen aus normalen Placenten ähnlich waren (71).

Die AD-Aktivität, die den in den placentaren Gewebsstückchen enthaltenen Blutanteilen zuzuschreiben sein könnte, ist nach SIM und MAGUIRE (7o) keineswegs signifikant.

Enzymaktivitätsbestimmung

Die pH-Stat-Methode wurde hier erstmals zur Bestimmung von Desaminasen-Aktivitäten verwendet.

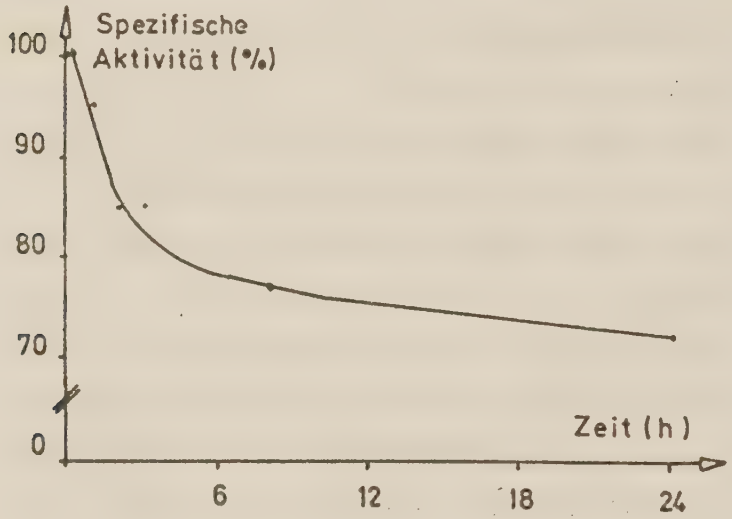
Ein Vergleich dieser Methode mit der spektrophotometrischen Methode (auf der Grundlage der unterschiedlichen Absorptionsspektren von Adenosin und Inosin bei 265 nm) ergab eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

Die Enzymaktivitäten der einzelnen subzellulären Fraktionen konnten nicht im Laufe eines Tages quantitativ und qualitativ untersucht werden. Sie wurden bei + 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Klärung der Frage nach der Haltbarkeit der Homogenate wurde ein Langzeit-Inkubationstest durchgeführt.

Die verschiedenen Zellfraktionen wurden jeweils bei 37° bis zu 24 Stunden inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeiten ihre Enzymaktivität mit AMP-5'-Na_2 als Substrat nach der pH-Stat-Methode gemessen wurde.

Inkubationszeit	Spezif. Aktivität
t_o	100 %
1 h	95
2	85
3	85
8	77,5
24	72,5

Änderung der spezifischen AMPD-Aktivität bei 37° C



Der Aktivitätsabfall von AMPD innerhalb von 24 Stunden bei 37° C und pH 7,4 betrug 27,5 %. Bei Kühlung (+ 4° C) waren die Zellfraktionen bis zu acht Tagen ohne nennenswerten Aktivitätsverlust haltbar.

Nach BRADY und O' SULLIVAN (5) zeigte die AD bis zu 24 Stunden bei 37° C, im pH-Bereich 5,9, keinen Aktivitätsverlust (wurde allerdings unter pH 4 und über pH 9,5 rasch inaktiviert).

2. Diskussion der Ergebnisse

Die subzelluläre Desaminasenverteilung in Placenta und Fruchtsack

Vergleichende Tabelle der Desaminasen-Aktivitäten von Placenta und Fruchtsack:

Zell-fraktion	Placenta			Fruchtsack		
	AD	AMPD	CMPD	AD	AMPD	CMPD
Hom	3,5	14,1	5,3	6,o	23,1	9,1
N	3,2	7,5	3,2	8,8	35,5	22,1
M	2,8	23,9	11,2	2,3	24,2	9,2
Ms	5,8	32,8	27,7	1o,9	55,8	23,1
Cy	2,1	14,7	2,1	37,5	15 o	25

Spezifische Enzymaktivitäten $\frac{\text{nMol Substrat/Min}}{\text{mg Protein}}$

Zeichenerklärung:

Hom: Homogenat

N: Kernfraktion

M: Mitochondrienfraktion

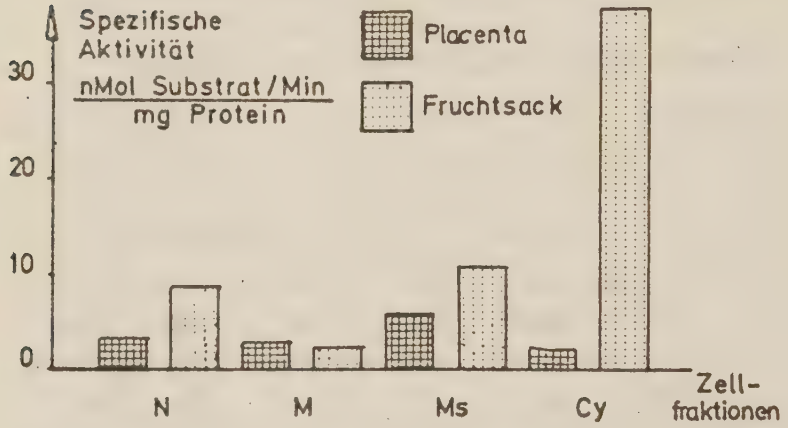
Ms: Mikrosomenfraktion

Cy: Cytoplasmatische Fraktion

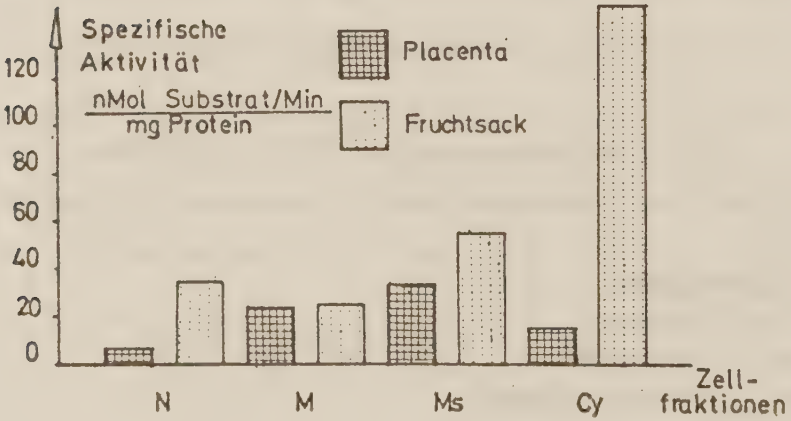
Pl: Placenta

Fs: Fruchtsack

Vergleichendes Diagramm der Adenosindesaminasen-Aktivitäten von Placenta und Fruchtsack



Vergleichendes Diagramm der Adenylatdesaminasen-Aktivitäten von Placenta und Fruchtsack



Vergleich der eigenen Befunde mit Ergebnissen anderer Autoren (Literatur)

In allen subzellulären Fraktionen von Placenta und Fruchtsack konnte AD, AMPD und CMPD nachgewiesen werden. In der Placenta waren die spezifischen Aktivitäten dieser Desaminasen am höchsten in der Mikrosomenfraktion, im Fruchtsack hingegen in der Cytoplasmatischen Fraktion. Diese unterschiedliche Lokalisierung deutet darauf hin, daß im Gegensatz zur Placenta die Desaminasen des Fruchtsacks in erster Linie in löslicher, freier Form im Cytosol (Cytoplasmatische Fraktion) vorliegen. Möglicherweise kommen die genannten Desaminasen auch in strukturgebundener Form in den subzellulären Membrananteilen sowohl der Placenta als auch des Fruchtsacks vor.
Die spezifische Aktivität der AMPD (in Placenta und Fruchtsack) war wesentlich höher als die der AD. Das durchschnittliche Verhältnis der Enzymaktivitäten AD : AMPD betrug ca. 1 : 5.

Die spezifischen Aktivitäten von AD, AMPD und CMPD lagen im Fruchtsack durchschnittlich höher als in der Placenta. Die Verteilungsmuster der Desaminasen von Adenosin, 2'-Desoxyadenosin und 2',3'-Isopropylidenadenosin stimmten in der Mikrosomenfraktion überein, variierten jedoch gering in den übrigen Fraktionen. Die spezifische Aktivität der Cytidindesaminase der Placenta war in der Cytoplasmatischen Fraktion am höchsten.

Da bisher keine Untersuchungen an menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe zum Vergleich vorliegen, ist hier nur ein Vergleich mit Befunden an tierischen Organen möglich.

Die folgende Tabelle zeigt die Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten in Mikrosomenfraktion und Cytoplasmatischer Fraktion von AD und AMPD in menschlicher Placenta bzw. Fruchtsack und denen verschiedener tierischer Organe (Literatur):

	Enzymaktivität überwiegend in der Mikrosomenfraktion			
Placenta Mensch	AD	Myokard	Kaninchen	(65)
	AMPD	Myokard	Kaninchen	(65, 67, 68)
		Skelettmuskel	Kaninchen	(69)
			Ratte	(ZOCH, unveröff.)
	Enzymaktivität überwiegend in der Cytoplasm. Fraktion			
Fruchtsack	AD	Leber	Ratte	(55, 58)
			Huhn	(60)
		Gehirn	Ratte	(59)
			Maus	(54)
			Kaninchen	(57, 61, 66)
		Mucosa	Rind	(62)
Mensch	AMPD	Leber	Ratte	(52)
		Gehirn	Ratte	(48)
			Kaninchen	(61)

Die Gegenüberstellung zeigt deutlich eine Parallele in der Verteilung der AD- und AMPD-Aktivitäten von tierischem Muskelgewebe und menschlicher Placenta einerseits, sowie von tierischem Leber- und Gehirngewebe und menschlichem Fruchtsack andererseits. Es stellt sich die Frage nach den Interpretationsmöglichkeiten aus diesen Parallelen.

Wie in der Literaturübersicht in Teil A bereits erwähnt, spielen AD und AMPD eine wichtige Rolle in der Regulierung der Durchblutung.

Adenosin und AMP haben starke Wirkungen auf das Säugerherz- und Gefäßsystem und können - insbesondere im Zustand der Ischämie oder Hypoxie - Bradycardie, Herzblock und koronare Gefäßerweiterung hervorrufen (22-24). Die vasodilatatorische Aktivität von Adenosin wird durch die rasche Desaminierung zu Inosin aufgehoben (26, 3o). Die AD und AMPD haben also die Aufgabe, die durch einen Zustand des Sauerstoffmangels hervorgerufene Erhöhung des Adenosin- und AMP-Spiegels zur Norm zu senken.
Es wäre demnach denkbar, daß - in ähnlicher Weise wie beim Säugerherzen - auch in der Placenta diese Enzyme eine Rolle in der Durchblutungsregulation spielen.
Eine Sauerstoffverarmung des Placentablutes müßte nach diesem Mechanismus zu einem Ansteigen des Adenosinspiegels und dadurch zu einer reaktiven Dilatation der Gefäße führen und so einer Hypoxie des kindlichen Blutes entgegenwirken. Durch die sofortige Desaminierung zu Inosin würde die vasodilatatorische Aktivität des Adenosins aufgehoben und dadurch ein verlangsamter

Blutstrom (Gefahr der Thrombenbildung) verhindert. Außerdem würde durch die rasche Desaminierung in der Placenta ein Übertritt von Adenosin in den mütterlichen Kreislauf verhindert. Daß dies von wichtiger physiologischer Bedeutung sein muß, zeigen die Beobachtungen von SIM und MAGUIRE (7o), die feststellten, daß die AD-Aktivität in der Placenta uterina von verschiedenen Säugerspecies höher war als in der Placenta fetalis. Der rasche Abbau des Adenosins müßte demnach für den mütterlichen Organismus wichtiger sein als für den kindlichen. Gefäßerweiternde Adenosinwirkungen könnten also mehr auf kindlicher als auf mütterlicher Seite zum Tragen kommen.

Die vielfältigen Aufgaben im gesamten Stoffwechselgeschehen sind sicherlich nicht nur auf die Placenta beschränkt, sondern erstrecken sich auf das gesamte, den Keimling ernährende und schützende Organ, also auch auf den Fruchtsack.

So ist nach BERTOLINI (76) außer dem Stofftransport durch die Placenta ein paraplacentarer Weg wahrscheinlich: Die Stoffe gelangen aus den Arterien der Decidua über uterinen und fetalen Teil des Fruchtsackes ins Fruchtwasser und erreichen durch die Haut und durch Aufnahme in das Verdauungssystem das Körperinnere des Keimlings. Ebenso gelangen in umgekehrter Richtung aus dem Fruchtwasser Abbaustoffe des Kindes über die Barriere des Fruchtsackes in den mütterlichen Kreislauf.

Wie bereits an tierischen Organen (Mucosa, Leber) nachgewiesen wurde, kann die Einwirkung bestimmter Gifte - im Sinne einer Enzyminduktion -

zu einem Anstieg der AD- und AMPD-Aktivitäten führen (51, 52). Möglicherweise sind die gegenüber der Placenta im Fruchtsack wesentlich höheren AD- und AMPD-Aktivitäten durch enzyminduzierend wirkende Abbauprodukte des Keimlings bedingt, die ins Fruchtwasser ausgeschieden werden, oder durch schädigende Stoffe aus dem mütterlichen Kreislauf (Medikamente, Gifte, Stoffwechselprodukte), die über die Decidua-Arterien ins Fruchtwasser gelangen könnten.

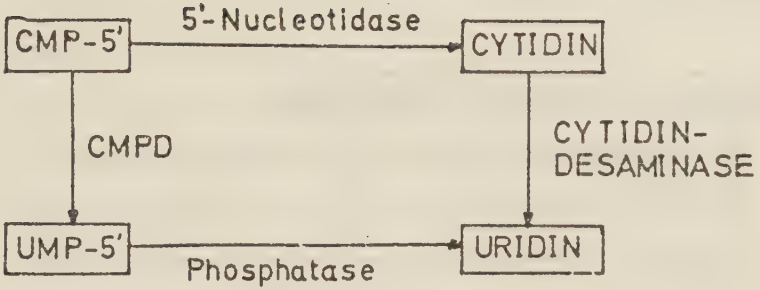
Der Fruchtsack wäre demnach dem Epithel der Darmzotten vergleichbar. Er nimmt Stoffe auf, verarbeitet sie und verhindert dadurch den Übertritt schädigender Substanzen in den (sowohl mütterlichen als auch fetalen) Kreislauf.

Der Fruchtsack ist wahrscheinlich für die Regulierung des Nucleosid- und Nucleotid-Stoffwechsels zwischen Fruchtwasser und maternem Gewebe verantwortlich und dürfte darüber hinaus als ein aktives Entgiftungsfilter anzusehen sein, das den Durchtritt von Schadstoffen in jeder Transportrichtung durch Enzymwirkungen verhindert.

Was die höhere spezifische Aktivität der AMPD gegenüber der AD (in Placenta und Fruchtsack) betrifft, die auch von anderen Autoren gefunden wurde (75), so zeigen sich hier interessante Aspekte im Vergleich zu den Verhältnissen im Gehirn. Während in Placenta und Fruchtsack

ein Verhältnis von ca. 1 : 5 vorliegt, fanden KLUGE und WIECZOREK (59) im Rattenhirn ein Verhältnis von ca. 1 : 10; außerdem wurde ein Abfall der AD-Aktivitäten mit zunehmendem Alter der Tiere gefunden.
In der menschlichen Placenta fand sich im Hinblick auf die AD-Aktivität kein signifikanter Unterschied zwischen erstem Drittel der Schwangerschaft und Term (7o, 72).
Hieraus könnte man den Schluß ziehen, daß die Enzymausstattung in Placenta und Fruchtsack typisch für - in bezug auf Stoffwechselleistungen - relativ omnipotentes Gewebe ist, während das mehr einseitige Überwiegen eines Enzyms im Gehirn typisch für hochspezialisiertes Gewebe sein mag.
Bei Fruchtsack und Gehirn findet sich eine überwiegende Lokalisation der AD und AMPD in der Cytoplasmatischen Fraktion, während sie in der Placenta überwiegend in der Mikrosomen-Fraktion zu finden ist. Diese Parallelität von Fruchtsack und Gehirn könnte aus dieser Sicht für einen ausgeprägteren Grad der Spezialisierung des Fruchtsackgewebes auf bestimmte enzymatische Aufgaben sprechen als er in der für universelle Funktionen ausgestatteten Placenta vorliegt.

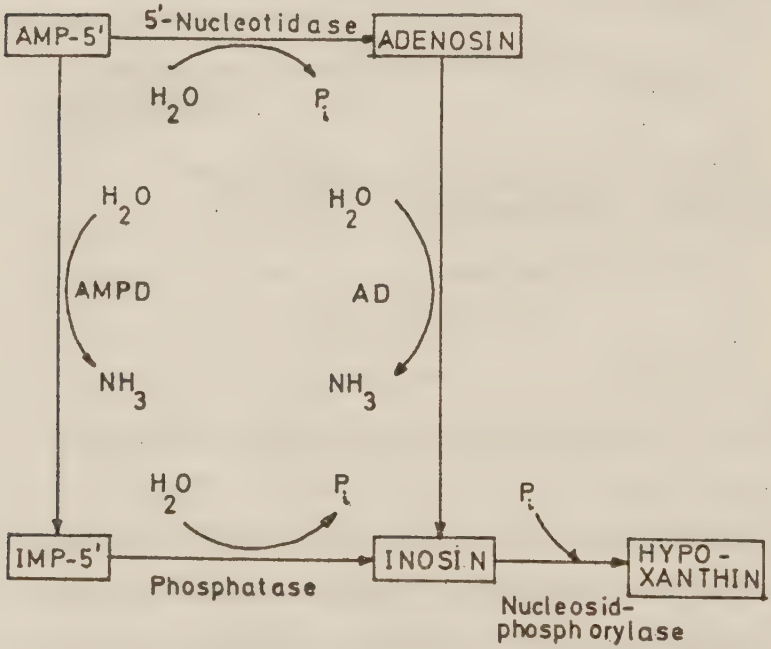
Der 5'-CMP-Abbau in der menschlichen Placenta wurde bereits von HAYASHI und OLMSTED beschrieben (73) - allerdings ohne die Desaminierung. In Ergänzung der Befunde dieser Autoren kann jetzt das Abbauschema des CMP vervollständigt werden:



Mit der pH-Stat-Methode konnte diese Desaminierung quantitativ aufgezeichnet werden.

Das bei der Desaminierung von CMP entstandene 5'-Uridinmonophosphat (5'-UMP) konnte vom CMP unter den angegebenen Versuchsbedingungen dünnschichtchromatographisch nicht abgetrennt werden.

Der Abbau von Adenosin, AMP und CMP in den subzellulären Fraktionen von Placenta und Fruchtsack



HAYASHI et al. (71) berichteten über den Abbau des AMP-5' in menschlichem Placentahomogenat zu Adenosin, Inosin und Hypoxanthin. Die Autoren vermuten die Möglichkeit der Desaminierung zu IMP-5', konnten jedoch in ihrem Versuchsansatz kein IMP nachweisen.

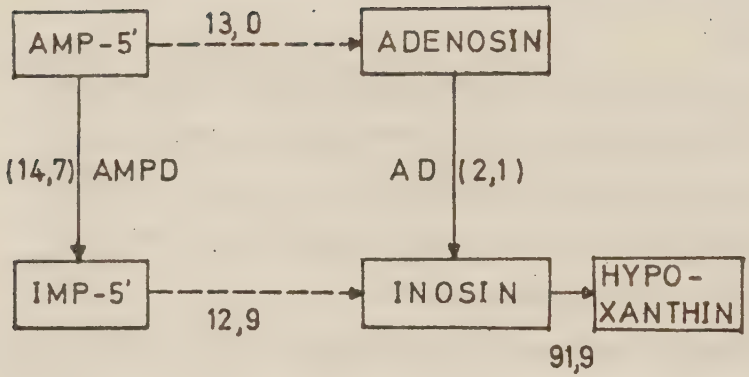
Durch die Dünnschichtchromatographie konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß in Placenta und Fruchtsack AMP-5' sowohl zu Adenosin

dephosphoryliert, als auch zu IMP-5' desaminiert wird.

Anhand der vorliegenden Befunde läßt sich folgendes über den AMP-Abbau sagen:
Beim AMP-Abbau laufen Desaminierung und Dephosphorylierung parallel, es werden also gleichzeitig IMP und Adenosin gebildet. Adenosin dient sogleich als Substrat für die AD und es entsteht so Inosin. Die AMPD ist sehr viel aktiver als die AD. Primär muß also mehr IMP aus AMP entstehen als Inosin aus Adenosin entsteht.
Dünnschichtchromatographisch wurde festgestellt, daß nach wenigen Minuten mehr IMP als Adenosin und Inosin vorhanden war.

Nach längerer Zeit nehmen IMP, Adenosin und AMP ab, Inosin hingegen zu. Demnach müssen bei gleichzeitigem Abbau von AMP (auf beiden Wegen) sowohl IMP als auch Adenosin weiterhin zu Inosin dephosphoryliert bzw. desaminiert worden sein.

Hypoxanthin entsteht kurz nach der Inosinbildung, was auf eine ausgeprägte Aktivität der Nucleosidhydrolyse bzw. Nucleosidphosphorylase zurückzuführen ist.
Diese Schlußfolgerung aus den vorangegangenen Untersuchungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von HAYASHI et al. (71), die in Placenta-Homogenat die Phosphatase-Aktivität gemessen haben:



Die Zahlen geben die jeweilige spezifische Aktivität des betreffenden Enzyms in der 30000 g/60'-Überstand-Fraktion an.
Die Zahlen in Klammern stellen die eigenen Ergebnisse der spezifischen Aktivität der Cytoplasmatischen Fraktion (Cy = 105 000 g/60'- Überstand) dar.

Nach KLUGE und WIECZOREK (59) wird im Gehirn (Ratten) das AMP hauptsächlich desaminiert und nur in geringem Umfang dephosphoryliert. Nach Ansicht dieser Autoren liegt eine der wichtigsten Quellen für die intrazelluläre Ammoniakbildung im AMP, dessen hydrolytische Desaminierung zu IMP sowohl in die Synthese der Guaninnucleotide führt, als auch den endgültigen Abbau zur Harnsäure einleitet (59).

Das Endprodukt IMP ist als Kreuzungspunkt im Stoffwechsel der Purinnucleotide von außerordentlicher Bedeutung. Das durch Dephosphorylierung von AMP entstehende Adenosin als Substrat der AD scheint - wie bereits erwähnt - eine Rolle in der Durchblutungsregulation zu spielen.

Der Nachweis des Adenosinabbaus über Inosin zu Hypoxanthin steht im Einklang mit Untersuchungen anderer Autoren (71), die einen Abbau über Adenin zu Hypoxanthin ausschließen konnten. Das Fehlen von Adenase in menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe konnte hier ebenfalls bestätigt werden.

Der Abbau des CMP-5′ zu Cytidin wurde bereits für menschliches Placenta-Homogenat beschrieben (72). Das Vorkommen von CMPD im Fruchtsack wurde erstmalig nachgewiesen.

Mit der pH-Stat-Methode konnte eine Desaminierung des cyclischen AMP-5′ nicht beobachtet werden. Ein Abbau wurde jedoch sowohl in der Placenta als auch im Fruchtsack dünnschichtchromatographisch erfaßt.

C. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden neben einer Zusammenstellung über Vorkommen und Bedeutung von Adenosin- und Adenylatdesaminase folgende Untersuchungen vorgenommen:

1. Die subzelluläre Verteilung von Adenosindesaminase (AD), Adenylatdesaminase (AMPD) und Cytidinmonophosphatdesaminase (CMPD) in menschlicher Placenta und Fruchtsack (Eihäute, Fetale Membranen) wurde quantitativ ermittelt.

2. Die Abbauwege von Adenosin, AMP und CMP in den verschiedenen intrazellulären Fraktionen von menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe wurden aufgezeigt.

1. Methodik

Aus reifen Term-Placenten und Fruchtsäcken wurden nach Methoden der differenzierten Zellfraktionierung die Kernfraktion (K), die Mitochondrienfraktion (M), die Mikrosomenfraktion (Ms) sowie die Mikrosomenüberstandsfraktion (Cytoplasmatische Fraktion, Cy) hergestellt. Der Proteingehalt jeder Fraktion wurde nach der KJELDAHL-Methode bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden nach der pH-Stat-Methode quantitativ auf ihre Desaminasenaktivitäten hin untersucht. Aus Substratumsatz und Eiweißgehalt wurde jeweils die spezifische Desaminasenaktivität der einzelnen Fraktion

errechnet. Der qualitative Nachweis der Desaminasenaktivität erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Die Versuchsergebnisse wurden statistisch ausgewertet (Errechnung von Standardabweichung und Variationskoeffizient).

II. Ergebnisse

1. Subzelluläre Verteilung

In allen subzellulären Fraktionen von menschlicher Placenta und Fruchtsack wurden AD, AMPD und CMPD nachgewiesen, wobei die spezifischen Aktivitäten der gesamten Desaminasen im Fruchtsack durchschnittlich höher als in der Placenta liegen. In der Placenta sind die spezifischen Aktivitäten von AD (5, 8), AMPD (32,8) und CMPD (27,7) am höchsten in der Mikrosomenfraktion, im Fruchtsack mit (37,5), (150) und (25) am höchsten in der Cytoplasmatischen Fraktion.

Die Desaminierungsverteilungsmuster von Adenosin, 2-Desoxyadenosin und 2', 3'-Isopropylidenadenosin stimmen in der Mikrosomenfraktion überein, variieren jedoch gering in den übrigen Fraktionen.

Die spezifische Aktivität der AMPD in Placenta und Fruchtsack ist wesentlich höher als die der AD; das durchschnittliche Verhältnis beträgt ca. 5 : 1.

2. Abbauwege

Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß in Placenta und Fruchtsack AMP-5′ sowohl zu Adenosin dephosphoryliert, als auch zu IMP-5′ desaminiert wird. Weiterhin erfolgte der IMP-Abbau schneller als der Adenosin-Abbau, d.h. die IMP-Phosphatase ist aktiver als die AD. Die rasche Hypoxanthinentstehung unmittelbar nach der Inosinbildung ist Zeichen einer hohen Aktivität der Nucleosidphosphorylase.

Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte das von HAYASHI et al. (71) aufgestellte Schema über die quantitativen Phosphatase-Aktivitäten in Placentahomogenat durch die quantitative Erfassung der AD und AMPD-Aktivitäten erweitert bzw. ergänzt werden.

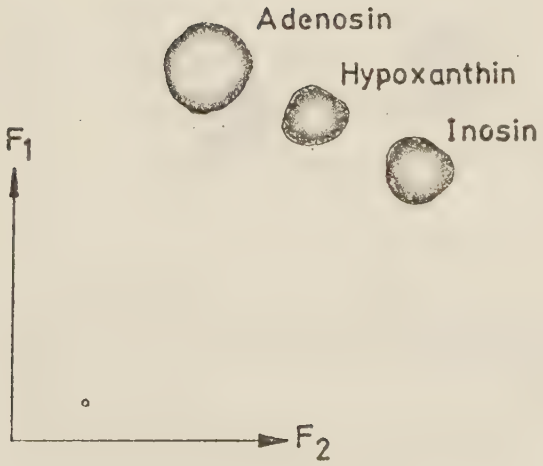
Das Vorkommen von Adenase in menschlichem Placenta- und Fruchtsackgewebe konnte nicht nachgewiesen werden.

Anhand der zusammengestellten Literaturübersicht und der eigenen Befunde wurden die Rolle des Adenosin und AMP sowie deren Desaminasen in der Durchblutungsregulation der Placenta diskutiert.
Aufgrund der ausgeprägten Desaminasen-Aktivität dürfte der Fruchtsack für die Regulierung des Nucleosid- und Nucleotid-Stoffwechsels zwischen Fruchtwasser und maternem Gewebe verantwortlich sein und darüber hinaus als aktives Entgiftungsfilter anzusehen sein, das den Durchtritt schädlicher Substanzen in jeder Transportrichtung durch Enzymwirkungen verhindert.

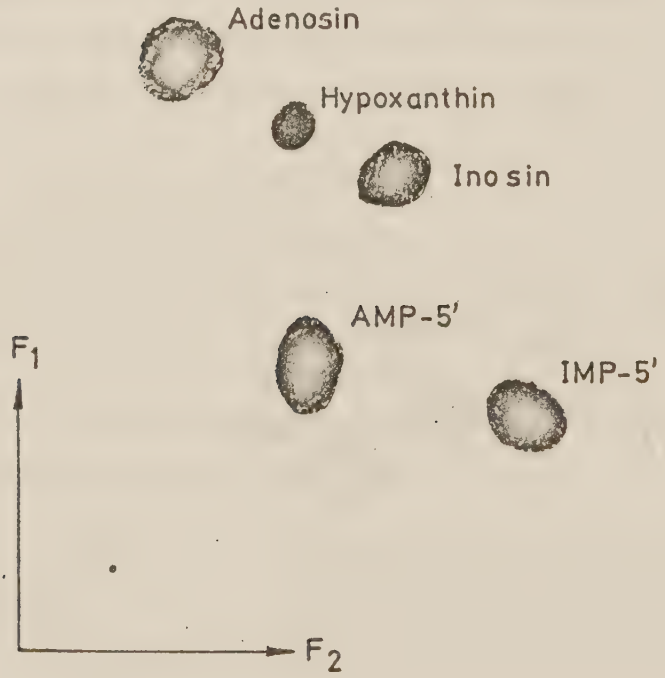
D. ANHANG

Chromatogramme

Substrat	Adenosin
Extrakt	Placenta-Mikrosomenfraktion (Pl - Ms)
Irkubations-zeit	60 Minuten



Substrat	AMP-5'-Na_2
Extrakt	Placenta-Mikrosomenfraktion (Pl - Ms)
Inkubations-zeit	30 Minuten



ERLÄUTERUNGEN

Abkürzungen:

AD	Adenosindesaminase
	Adenosinaminohydrolase EC 3.5.4.4.
AMP	hier: AMP-5′
	Adenosinmonophosphat, Adenylsäure
AMPD	Adenylsäuredesaminase, Adenosinmonophosphataminohydrolase EC 3.5.4.6.
IMP	hier: IMP-5′
	Inosinmonophosphat, Inosinsäure
CMP	hier: CMP-5′
	Cytidinmonophosphat, Cytidylsäure
CMPD	Cytidinmonophosphataminohydrolase
P_i	Anorganisches Phosphat

- Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten. -

E. LITERATUR

1. KAPLAN, N.O. in COLDWICK, S.P. and KAPLAN, N.O.: Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 2 (1951), 473

2. BRADY, T.G.: Biochem.J. 36 (1942), 478

3. YORK, J.L. and G.A. LE PAGE: Kinetic study of the deamination of some adenosin analogs - substrate specitity of adenosine deaminase. Canad. J. Biochem. 44 (1966), 331

4. BENDALL, J.R., G.L. DAVEY: Ammonia liberation during rigor mortis and its relation to changes in the adenine and inosine nucleotides of rabbit muscle. Biochem.Biophys.Acta 26, (1957) 93-1o3

5. BRADY, T.G., C.J. O'DONOVAN : Survey of the distribution and nature of adenosine deaminases. Influence of pH and urea on the activity of mammalian ADA. Biochem. J. 8o (1961), 17

6. PURZYNSKA, J., and M. ZYDOWO: Bull.Acad. Polon. Sci. S. sci. biol. 8, (196o), 438

7. SOLOMON, J.B.: Constitutive Enzymes of the Developing Chick Embryo: Adenosine Deaminase. Biochem. J. 75 (196o), 278

8. BODANSKY, O.: Enzyme in Health and Disease Charles C. Thomas Publishers, Springfield Ill, Vol. III (196o)

9. BRADY, T.G., C.I. O'DONOVAN: A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammalian species. Comp. Biochem. Physiol. 14 (1965) 101-120

10. MURPHY, P.M., M. NOONAN, P. COLLINS, E. TULLY, T.G. BRADY: Preparative isolation of the isoenzymes of adenosine deaminase from bovine mucosa by ionexchange chromatography. Biochem. Biophys. Acta 171 (1), (1969), 157-66

11. CORY, J.G., G. WEINBAUM, R.J. SUHADOLNIK: Multiple forms of calf serum adenosin deaminase. Arch.Biochem.Biophys., 118 (1967), 428

12. WOLFENDEN, R., Y. TMOZAWA, B. BAMMAN: Takadiastase Adenosine Deaminase, Calf Duodenal ADA, and Rabbit Muscle AMP-Deaminase. A comparison of physical Properties and Amino Acid Composition. Biochemistry 7, 11 (1968), 3965-70

13. RESSLER, N.: Tissue-characteristic forms of adenosine deaminase. Clin.Chim.Acta 24, (1969), 247-251

14. MURPHY, P.M., T.G. BRADY, W.A. BOGGUST: Molecular weight of adenosine deaminase in a number of species. Biochem.Biophys. Acta 188 (2) (1969), 341-144

15. PHELAN, J., F. Mc EVOY, S. ROONEY: Structural studies on adenosine deaminase from calf intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta 200 (2) ,(1970) , 370-7

16. MAGUIRE, M.H., M.K. SIM: Studies on adenosine deaminase 1. Purification and some properties of bovine placental adenosine deaminase. 2. Specifity and mechanisme of action of bovine placental adenosine deaminase. Europ. J. Bioch., 23 (1), (1971), 17 - 21, 22 - 29

17. BANCARI, M.B.: Adenylic acid, adenosine, and sulfhydryl groups reactivity of adenosine deaminase. Corriere Farm. 22 (13), (1967), 295-8

18. MURPHY, P.M.: Disufide bonds in relation to the activity and structure of adenosine deaminase. Bioch.J. 11o (2), (1968), 17

19. RONCA, G., C. BAUER, S. TESTONI, C.A. ROSSI: Sufhydryl groups and adenosine deaminase activity. Boll.Soc.Ital. Biol.Sper., 41 (4) (1965), 163 - 6

2o. MURPHY, P.M.: Studies on the thiol content of bovine adenosine deaminase. Bioch. J. 1o3 (2) (1967)

21. RONCA, G., C. BAUER, C.A. ROSSI: Role of sulfhydryl groups in adenosine deaminase. Europ. J. Bioch. 1 (4), (1967), 434-8

22. DRURY, A.N., A. SZENT-GYÖRGY: J. Physiol.(London), 68, (1929) 213, zit. nach 24.

23. GREEN, H.N., H.B. STONER: Biological Actions of the Adenine Nucleotides. Lewis, London, 195o

24. ROCKWELL, M., M.H. MAGUIRE: Studies on Adenosine Deaminase. Mol. Pharmacol. 2, (1966), 574-584

25. BERNE, R.M.: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. Amer.J.Physiol. 2o4 (1963), 317 - 322

26. BERNE, R.M.: Physiol. Rev. 44, 1 (1964) zit. nach 24

27. BUSCH, E.W., I.M. VON BORCKE, B. MARTINEZ: Abbauwege und Abbaumuster der Purinnucleotide in Herz-, Leber- und Nierengewebe vom Kaninchen nach Kreislaufstillstand. Biochim. Biophys. Acta 166 (1968), 547-556

28. RUBIO, R., R.M. BERNE, M. KATORI: Release of adenosine in reactive hyperemia of dog heart. Amer.J.Physiol. 216 (1969), 56 - 62

29. BAER, H.P., G.I. DRUMMOND, E.L. DUNCAN: Formation and deamination of the adenosine by cardiac muscle enzymes. Molecular Pharmacology, 2 (1), (1966), 67-76

3o. GERLACH, E., B. DEUTICKE, R.H. DREISBACH: Naturwissenschaften, 5o, (1963), 228, zit. nach 29

31. BURGER, R., J.M. LOWENSTEIN: Adenylate Deaminase, Regulation of deamination pathways in extracts of rat heart and lung. J. Biol. Chem. 242 (22), (1967), 5281-5288

32. WILLIAMSON, J.R.: J. Biol. Chem. 241 (1966) , 5o26, zit. nach 31

33. GALY-FAJOU, M., C.E. SRIPATI, Y. KHOUVINE: L'adenosine désaminase dans le métabolisme cellulaire. Bull.Soc.Chim.biol. 51, (4) (1969) 763-773

34. HUGUES, A.: Eptl. cell Res. 3, (1952), 1o8, zit. nach 33

35. LANGER, L., H. KLENOW: The effect of some purine deoxyribosides on the incorporation of (^{14}C) formate and (^{32}P) orthophosphate into DNA of ascites tumor cells in vitro. Biochim.Biophys. Acta, 37 (196o), 33

36. MUNCH-PETERSON, A.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 3 (196o), 392

37. AMMON, R.: Die Hydrolasen in: Fermente, Hormone und Vitamine. R. AMMON, W. DIRSCHEL, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1959, Bd.1

38. STRAUB, F.B., O. STEPHANECK, S. ACS: Biochem. 22 (1957) 111

39. KOEHLER, L.H., E.S. BENZ: Clin. Chem. 8 (1962), 133

4o. LETANSKY, K., F. SOELICH: Krebsarzt 2 (1958), 8o

41. SCHWARTS, M.K., O. BODANSKY: Proc.Soc.exptl. Biol.Med. N.Y. 1o1 (1959), 56o

42. HANKIEWICZ, J., B. ANTES: Adenosine Deaminase in the serum of patients with liver diseases. Enzymologia, Acta biocatalytica, 35 (2) (1968), 53 - 6o

43. MÜLLER-BEISSENHIRTZ, W., H. KELLER: Dtsch.med.Wschr. 91 (1966), 159

44. GALANTI, B., G. GIUSTI: Boll.Soc.Biol.Sper., 45 (1969), 327

45. MILLER, RUSSELL, L., RESSLER, NEWTON: Activity of serum deoxycytidylate deaminase in various diseases. Clin. Chim. Acta, 26 (3) (1969), 405-12

46. RONCA-TESTONI, S., A. RAGGI, G. RONCA: Muscle AMP aminohydrolase. Biochim.Biophys.Acta 198, (1970), 101-112

47. RAGGI, A., S. RONCA-TESTONI, G. RONCA: Muscle AMP aminohydrolase. II. Distribution of AMP amino-hydrolase, myokinase activities in skeletal muscle. Biochim.Biophys. Acta 173 (1969), 619-22

48. KLUGE, H., V. WIECZOREK: Der Einfluß von Ascorbinsäure auf die zytoplasmatische AMP-Aminohydrolase des Rattenhirns. Biochim. Biophys. Acta 167, (1968) 621 - 622

49. SETLON, B., J.M. LOWENSTEIN: J.Biol.Chem. 242 (1967), 607

50. SMITH, L.D., D.E. KIZER: Purification and properties of rat liver AMP deaminase. Biochim.Biophys. Acta, 191 (1969), 415-424

51. DAVID, GABOR: Change in the activity of adenosine deaminase skeletal and cardiac muscles during experiment poisoning with organophorus substances. Voenno Med. Zh. 2 (1970), 31-34 (Russ).

Engl. Summary from Chemical Abstracts 74/41 (1971), 74/1768 (1971)

52. KIZARD, D.E., C.D. SMITH, B.A, AOWELL: Kinetic and immunochemical evidence for induction of hepatic adenosine monophosphate deaminase by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene or thioacetamide. Biochem.Pharmacol. 19 (4), (197o), 1263-76

53. DE DUVE, C. R. WATTIAUX, et P. BAUDHUIN: Advances in Enzymology, 24, (1962), 290 Interscience, New York, zit. nach 33

54. MUSTAFA, S.J., C.P. TEWARI: Studies on adenosine deaminase in mouse liver and spleen. Enzymologia, 38 (3), (1969), 177-188

55. DE LAMIRANDE, G., G. ALLARD, A. CANTERO: Purine metabolizing enzymes in normal rat liver Nandovikoff Hepatome. Cancer Res., 18 (1958),952

56. SCHNEIDER, W.C., G.M. HOGEBOOM: Intracellular distribution of enzymes IX. certain purine-metaboli zing enzymes. J. biol. Chem. 195 (1952), 161 zit. nach 55

57. JORDAN, W.K., R. MARCH, O.B. HOUCHIN, E. POPP: Intracellular partition of purine deaminases in rodent brain. J. Neurochem. 4 (1959), 17o zit. nach 55

58. FIALA, S., H.E. KASINSKY: Enzymic deamination of deoxyadenylic and adenylic acids by normal and cancerous rat liver tissues. J. Natl. Cancer Inst., 26, (1961), 1o59-73

59. KLUGE, H., V. WIECZOREK: Die Aktivitäten von Adenylsäure- und Adenosin-Desaminasen in Hirnregionen von Ratten verschiedener Altersstufen. Acta biol.med.germ., 21 (1968), 271-278

60. SOLOMON, J.B.: Constitutive enzymes of the developing chick embryo : ADA. Biochem. J. 75 (1960), 278-84

61. PALLADIN, A.V., N.M. POLYAKOVA, M.K. MALYSHEVA: Deaminases of the brain and of its intracellular structures. Biokhim.Funkts.Verw.Sist. Mater Mezhdunar.Simp. Leningrad, (1965), 104-9 (Pub. 1967, Russ.) Engl. Summary from Chemical Abstracts 1966

62. STERN, H., A.E. MIRSKY: Soluble enzymes of nuclei isolated in sucrose and nonaqueous media. A comparative study. J.Gen. Physiol., 37 (1953), 177-87

63. ALLFERY, V., H. STERN, A.E. MIRSKY: Some enzymes in isolated cell nuclei. Nature, 169,(1952) 128-9

64. STERN, H., V. ALLFERY A.E. MIRSKY, H. SALTREN: Some enzymes of isolated nuclei. J. Gen. Physiol., 35 (1952) 559-78

65. NECHIPORENKO, Z.YU., E.G. GONCHARENKO: Deamination of AMP and adenosine , and dephosphorylation of AMP in subzellular structures of the myocardium in experimental aortic stenosis. Byull. Eksp. Biol.Med., 67 (2), (1969), 50-52 (Russ.) Engl. Summary from Chemical Abstracts 71 (1970) 1585

66. POLYAKOVA, N.H., M.K. MALISHEVA: Ukr. Biokhim. Zh. 33, (1961), 713 zit. nach 55

67. NECHIPORENKO, Z.YU.; Effect of adenylic acid concentration on the modes of its decomposition in myocardial microsomes. Ukr. Biokhim. Zh. 42 (1), (197o), 92-6 (Ukrain) Engl Summary from Chemical Abstracts 74 (1971)

68. NECHIPORENKO, Z.YU.; N.P. BARANOVA, V.B. PISKAREN: Deamination of AMP in heavy and light fractions of myocardial microsomes. Ukr.Biokhim.Zh., 42 (3) (197o), 329-34 (Ukrain). Engl. Summary from Chemical Abstracts 74 (1971) 9611

69. GOLOBOROD'KO, O.P., Z.YU. NECHIPORENKO: Deamination of adenylic acid in subcellular fractions of skeletal muscle. Ukr.Biokhim. Zh. 41, (4) (1969), 411-17 (Ukrain). Engl. Summary from Chemical Abstracts 74 (1971), 3o 1o8

7o. SIM, M.K., M.H. MAGUIRE: Variation in Placental Adenosine Deaminase Activity During Gestation. Biol. of Reproduct. 2 (2), (197o) 291 - 98

71. HAYASHI, T.T., R.C. BALDRIDGE, P.S. OLMSTED, D.L. KIMMEL: Purine nucleotide catabolism in placenta. AM. J.Obst.Gyn. 88, (1966), 47o-78

72. HAYASHI, T.T.: Studies on placental metabolism. II. Purine nucleotide catabolism in early placenta. Am.J.Obst.Gyn.93 (2), (1965) 266-268

73. HAYASHI, T.T., R.S. OLMSTED: Studies on placental metabolism. III. Pyrimidine nucleotide catabolism in human placenta. Am. J.Obst.Gyn. 91 (5), (1965), 711-713

74. WISDOM, G.B., B.A. ORSI: Purification and properties of cytidine aminohydrolase from sheep liver. Europ. J. Bioch., 7 (2) (1969), 223-30

75. MAKAREWICZ, W., E. MACKOWIAK: Adenosine-5'-monophosphate aminohydrolase of human placenta. Acta Biochim. Pol. , 18 (2), (1971), 135-42

76. BOENIG, Z., R. BERTOLINI: Leitfaden der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Edition Leipzig, 9. Auflage, 1967

77. BOURNE, G.: The Human Amnion and Chorion. Lloyd-Like (Medical Books) Ltd., London, 1962

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Prof.Dr.E. ZOCH herzlich danken, der stets lebhaftes Interesse am Fortgang der Arbeiten zeigte und mich bei allen auftretenden Schwierigkeiten tatkräftig unterstützte.

Mein Dank gilt auch Herrn J. BESCHMANN, der mich mit den speziellen Laboratoriumsmethoden vertraut machte, sowie ganz besonders der Universitäts-Frauenklinik Homburg, aus deren Kreißsaal ich mein stets frisches Untersuchungsmaterial (Placenta und Fruchtsack) beziehen konnte.

LEBENSLAUF

Ich, Rainer Rudolf HÄGE, wurde am 4. November 1945 in Neustadt an der Weinstraße als Sohn des Fernmelde-Ingenieus Hermann Häge und seiner Ehefrau Apollonia, geb. Hameder, geboren.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Lachen-Speyerdorf.

Von 1956 bis 1965 ging ich in das Staatliche Naturwissenschaftliche und Neusprachliche Leibnitz-Gymnasium in Neustadt, wo ich im März 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Von April 1965 bis Oktober 1966 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1966/67 immatrikulierte ich mich an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Nach drei Semestern Studium der Fächer Biologie und Chemie wechselte ich in die Medizinische Fakultät über.

Im Oktober 1968 bestand ich den naturwissenschaftlichen Teil der Ärztlichen Vorprüfung (Vorphysikum), im April 1970 die Ärztliche Vorprüfung (Physikum). Nach sechs Semestern klinischen Studiums legte ich im Juni 1973 das medizinische Staatsexamen ab.